

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Veronika Zušťáková

**SPECIAČNÍ ANALÝZA GLUTATHIONOVÝCH KOMPLEXŮ
ARSENU POMOCÍ ION-PÁROVÉ HPLC-ICP-MS**

Speciation analysis of arsenic-glutathione complexes by
ion-pairing HPLC-ICP-MS

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.; Inga Petry-Podgórska, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla ve spolupráci s Oddělením stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. jako součást výzkumného záměru MSM0021620857 a RVO: 68081715 a s podporou programu MŠMT Kontakt II, č. projektu LH 12040.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2. září 2013

Abstrakt a klíčová slova

Abstrakt:

Tato práce se zaměřila na separaci arseno-glutathionových specií za pomoci ion- párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Specie byly separovány na koloně Prodigy ODS (3) za použití vodné mobilní fáze obsahující 4,7mM tetrabutylamonium hydroxid (TBAH), 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanol o pH 5,85 v isokratickém módu. Jednoduché arsenové specie - arsenitan (iAs^{III}), arseničnan (iAs^V), methylarsenitan (MAs^{III}), methylarseničnan (MAs^V), dimethylarsenitan ($DMAs^{III}$) a dimethylarseničnan ($DMAs^V$), které sloužily jako arsenové standardy pro zjištění retenčních časů, se za těchto separačních podmínek podařilo úspěšně separovat. Arseno-glutathionové komplexy $As(GS)_3$, $MAs(GS)_2$ a $DMAs(GS)$ se nepodařilo separovat. Tyto komplexy poskytovaly píky jednoduchých arsenových specií. U komplexů $As(GS)_3$ a $MAs(GS)_2$ byly zaznamenány při prvním měření píky s navazujícím rozmytým signálem, který po opakovaných měřeních vymizel. Pravděpodobně se jedná o pozůstatek glutathionového komplexu, který se rozpadá na jednoduché specie.

Klíčová slova:

Arsen, arseno-glutathionové specie, ion-párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

Abstract:

The thesis has focused on the separation of arsenic-glutathione species using ion-pairing high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. Species were separated on chromatographic column Prodigy ODS (3) using an aqueous mobile phase containing 4.7mM tetrabutylammonium hydroxide (TBAH), 2mM malonic acid and 4% methanol at pH 5.85 in the isocratic mode. Simple arsenic species - arsenite (iAs^{III}), arsenate (iAs^{V}) monomethylarsenic acid (MAs^{III}), monomethylarsenous acid (MAs^{V}), dimethylarsenic acid (DMAs^{III}) and dimethylarsenous acid (DMAs^{V}), which served as arsenic standards to determine retention times, were successfully separated under these conditions. Arsenic-glutathione complexes $\text{As}(\text{GS})_3$, $\text{MAs}(\text{GS})_2$ and $\text{DMAs}(\text{GS})$ were not successfully separated. These complexes provided peaks of simple arsenic species. Peak broadening was observed in the first analysis of $\text{As}(\text{GS})_3$ and $\text{MAs}(\text{GS})_2$ complexes, which disappeared in subsequent analyses. This broadening probably represents a residual of glutathione complex which disintegrated to single species.

Key words:

Arsenic, arsenic-glutathione species, ion-pairing high performance liquid chromatography, inductively coupled plasma mass spectrometry

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D a Inze Petry-Podgórské, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a za pomoc při zpracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jakubu Hraníčkovi, Ph.D za všestrannou pomoc. Mé poděkování také patří vědeckému týmu z Oddělení stopové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. za umožnění spolupráce, ochotu a vstřícný přístup. A děkuji Ing. Liboru Havlíčkovi, CSc. z Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. za přípravu standardních látek.

Obsah

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2. 1 Arsen.....	9
2.1.1 Dopad arsenu na zdraví člověka	9
2.2 Nejdůležitější arsenové specie	10
2.2.1 Toxicita arsenových specií.....	10
2.2.2 Stabilita specií.....	12
2.3 Metabolizmus	13
2.3.1 Challengerova redukčně-oxidativně methylační dráha	13
2.3.2 Hayakawova metabolická dráha arsenu založena na arseno--glutathionových komplexech ...	14
2.3.3 Mechanismus navržený Suzukim a Naranmandurou	15
2. 4. HPLC-ICP-MS	16
2.4.1 Separační techniky v HPLC pro separaci arsenových specií	16
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1 Použité chemikálie.....	19
3.2 Příprava arsenových standardů	19
3.3 Příprava roztoků arseno-glutathionových komplexů	20
3.4 Přístrojové vybavení	21
3.5 Experimentální uspořádání a postup měření	21
3.6 Zpracování dat	23
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	24
4.1 Arsenové standardy	24
4.2 Arseno-glutathionové komplexy.....	25
4.2.1 Separace komplexu As(GS) ₃	25
4.2.2 Separace komplexu MAs(GS) ₂	27
4.2.3 Separace komplexu DMAs(GS).....	29
5 ZÁVĚR.....	32
Literatura	33

Seznam zkratek a symbolů

AS3MT	arsen(3+)methyltransferasa
As(GS) ₃	arsen triglutathion
DIV	deionizovaná voda
DMA ^{III}	dimethylarsenitan
DMA ^V	dimethylarseničnan
DMA(GS)	dimethylarsen glutathion
GSH	glutathion
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iAs ^{III}	anorganický arsenitan
iAs ^V	anorganický arseničnan
ICP-MS	hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem
IPC	ion-párová chromatografie
MA ^{III}	methylarsenitan
MA ^V	methylarseničnan
MA(GS) ₂	methylarsen diglutathion
M _r	relativní molekulová hmotnost
RPC	chromatografie s obracenými fázemi
S	signál (cps)
SAM	S-adenosylmethionin
t	čas (min)
TBAH	tetrabutylamonium hydroxid
t _r	retenční čas (min)
WHO	světová zdravotní organizace (World Health Organization)

1 ÚVOD

Arsen je jedním z nejrozšířenějších prvků v zemské kůře. Anorganické specie (arseničnan a arsenitan) se běžně vyskytují v podzemních a povrchových vodách. V důsledku toho je ohroženo zdraví mnoha lidí po celém světě, jelikož arsen je znám svou genotoxicitou a karcinogenitou.

Jeho toxicita závisí především na sloučenině a oxidačním stavu arsenu. Všeobecně je známo, že anorganický arsen je více toxický než organický a trojmocné arsenové specie jsou toxičtější než pětimocné.

Dnešní výzkumy se především soustřeďují na získání více informací o přesném mechanismu biotransformace arsenu v lidském těle. Dlouho uznávaná metabolická dráha arsenu popsána Challengerem je dnes doplněna o další alternativní mechanismy, které lépe popisují metabolismus arsenu.

Pro získání přesného mechanismu metabolismu arsenu je velmi důležité navrhnout takovou metodu, která by byla schopna metabolity arsenu separovat a detekovat. Dnes již byly separovány a detekovány jednoduché arsenové specie v přírodních i biologických vzorcích (moč) za různých separačních podmínek. Složitější arsenové specie se zatím nedaří tak úspěšně separovat, jako jednoduché specie.

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit separaci arseno-glutathionových komplexů pomocí v literatuře popsané metody založené na ion-párové vysokoúčinné kapalinové chromatografii s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2. 1 Arsen

2.1.1 Dopad arsenu na zdraví člověka

Arsen je dvacátý nejběžnější prvek vyskytující se v zemské kůře¹. V přírodě je arsen běžnou součástí hornin, půd a vod². Zde se může vyskytovat v organické či anorganické formě a může být ve čtyřech oxidačních stavech As^{III} , As^{V} , As^0 a $\text{As}^{-\text{III}}$. Existují různé přírodní procesy, jako biologická aktivita či zvětrávání, které způsobují uvolňování arsenu z hornin a půdy do podzemních a povrchových vod³. Díky lidské činnosti, která arsen využívala v mnoha odvětvích, jako například v zemědělství (herbicidy a pesticidy) a průmyslu, se koncentrace arsenu v přírodě zvyšuje. Arsen také může kontaminovat vzduch, kde je absorbován na prachové částice¹.

Člověk je vystaven arsenu kontaminovanou vodou, půdou, atmosférou a také potravinami³. Mezi nejrizikovější potraviny patří mořské plody a ryby, dále pak rýže a obiloviny. Největší celosvětový problém je kontaminace arsenu pitné vody². Nejvyšší dovolenou hladinu koncentrace arsenu v pitné vodě stanovuje Světová zdravotní organizace (WHO) a země Evropské unie na $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Koncentrace přesahující tuto normu může mít neblahý vliv na zdraví člověka³.

Mezi příznaky akutní otravy arsenem se řadí neurologické problémy, zvracení, průjem a bolesti břicha³. Při dlouhodobém vystavení arsenu se u člověka může objevit rakovina kůže, plic, močového měchýře a jater. Déle se může projevit hyperpigmentace kůže, respirační poruchy, kardiovaskulární a další onemocnění.

I přes nepříznivý vliv, je arsen využíván jako léčivo. Do nedávna se s ním ještě léčilo onemocnění syfilis (lék pod názvem salvarsan) a dnes se arsen trioxid používá na léčbu promyelotické leukémie.

2.2 Nejdůležitější arsenové specie

V přírodě a biologických materiálech se může vyskytovat více jak dvacet arsenových specií⁴. Většina těchto specií existuje v iontové formě. Tato práce se především zaměřuje na arsenové specie, které se vyskytují v lidské moči a žluči a mohou být součástí biotransformačního řetězce v lidském těle⁵.

2.2.1 Toxicita arsenových specií

Toxicita jednotlivých arsenových specií závisí na oxidačním stavu a na chemické formě³. Obecně jsou anorganické sloučeniny arsenu toxičtější než organické. Dále arsenité specie jsou toxičtější než arseničné, pravděpodobně protože trojmocné specie mají větší afinitu k thiolové skupině proteinů. Dále jsou více rozpustné a mobilní².

Toxicita jednotlivých specií pro lidské hepatocyty je následující: $\text{MAs}^{\text{III}} > \text{DMAs}^{\text{III}} = \text{iAs}^{\text{III}} > \text{iAs}^{\text{V}} > \text{MAs}^{\text{V}} = \text{DMAs}^{\text{V}}$ ⁶. V lidské moči se hlavně nalézají methylované arsenové specie MAs^{V} , DMAs^{V} , MAs^{III} , DMAs^{III} a nepřeměněné anorganické specie iAs^{V} a iAs^{III} ⁷. Jednotlivé struktury těchto arsenových jsou popsány v tabulce 2.1.

Předpokládá se, že komplexy trojmocného arsenu s glutathionem hrají důležitou roli v metabolismu a transportu anorganického arsenu a jeho methylovaných specií⁸. Toxicita arseno-glutathionových komplexů $\text{As}(\text{GS})_3$, $\text{MAs}(\text{GS})_2$ a $\text{DMAs}(\text{GS})$ je srovnatelná či vyšší než anorganický arsen⁵. Struktura arseno-glutathionových komplexů je zobrazena v tabulce 2.2.

Tab. 2.1 – Arsenové specie identifikované v lidské moči.

zkratka v textu	název sloučeniny	strukturní vzorec ⁷
iAs^{III}	anorganický arsenitan	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \diagup \\ \text{O}^- \text{---} \text{As} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{array}$
iAs^V	anorganický arseničnan	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \diagup \\ \text{O}^- \text{---} \text{As} = \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{array}$
MAs^{III}	monomethylarsenitan	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{O}^- \text{---} \text{As} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{array}$
MAs^V	monomethylarseničnan	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{O}^- \text{---} \text{As} = \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{array}$
DMA^{III}	dimethylarsenitan	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \text{---} \text{As} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{array}$
DMA^V	dimethylarseničnan	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \text{---} \text{As} = \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O}^- \end{array}$

Tab. 2.2 – Arseno-glutathionové komplexy.

zkratka v textu	název sloučeniny	strukturní vzorec ⁸
As(GS)₃	arsen triglutathion	$\begin{array}{c} \text{GS} \\ \diagup \\ \text{As} \text{---} \text{GS} \\ \diagdown \\ \text{GS} \end{array}$
MAs(GS)₂	methylarsen diglutathion	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{As} \text{---} \text{GS} \\ \diagdown \\ \text{GS} \end{array}$
DMA(GS)	dimethylarsen glutathion	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{As} \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{GS} \end{array}$

2.2.2 Stabilita specií

Pro identifikaci arsenových specií je velmi důležité vědět, jaká je stabilita jednotlivých specií. Často se stává, že se rozkládají či mění na jiné specie, což může mít neblahý vliv na správnost výsledků.

Stabilitou methylovaných arsenových specií MAs^{III} a DMAs^{III} v deionizované vodě a v lidské moči se zabývala práce Gonga et, al.⁵. Zde bylo zjištěno, že snížením teploty ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) se snižuje rozpad MAs^{III} na MAs^{V} . Snížená teplota také v menší míře zpomaluje rozpad DMAs^{III} na DMAs^{V} . Poté bylo dokázáno, že stabilita těchto specií je větší v deionizované vodě než v lidské moči. Větší nestabilita arsenové specie DMAs^{III} oproti MAs^{III} je pravděpodobně způsobeno nárůstem elektronové hustoty specie v důsledku přítomnosti methylové skupiny a tedy vyšší tendence specie se oxidovat.

Arsenové specie iAs^{III} , iAs^{V} , MAs^{V} a DMAs^{V} jsou ve srovnání s předchozími speciemi daleko stabilnější. Tyto specie ve vodném roztoku jsou stabilní při skladování ve $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ v tmavém prostředí¹⁰.

Nedávno bylo zjištěno, že iAs^{III} podaný nitrožilně či pozřením se vylučuje do žluče jako arseno-glutathionové komplexy ($\text{As}(\text{GS})_3$ a $\text{MAs}(\text{GS})_2$)¹¹. Stabilita těchto komplexů ve žluči byla zkoumána u myší. Bylo zjištěno, že komplexy ve žluči jsou nestabilní a rozpadají se na iAs^{III} a MAs^{III} . Komplex $\text{DMAs}(\text{GS})$ zatím ve žluči prokázán nebyl.

Ve vodném roztoku je nejstabilnější komplex $\text{DMAs}(\text{GS})$, poté $\text{MAs}(\text{GS})_2$ a nejméně stabilní je $\text{As}(\text{GS})_3$ ¹². Stabilita specií arseno-glutathionových komplexů ve vodném roztoku závisí především na pH roztoků, v kterých jsou rozpuštěny. Komplex $\text{As}(\text{GS})_3$ je stabilní při pH 2,0, zatímco $\text{DMAs}(\text{GS})$ a $\text{MAs}(\text{GS})_2$ jsou stabilní při pH 4,3. Proto je vhodné při přípravě roztoků rozpouštět tyto komplexy v 0,1% kyselině mravenčí.

Také teplota má velký vliv na stabilitu těchto komplexů⁹. Při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ je stabilita komplexů daleko menší než při 4°C . Na závěr lze říct, že se vzorky obsahující arseno-glutathionové komplexy se musí pracovat velmi opatrně. Neustále musí být chlazeny a analyzovány hned, jak je to možné.

2.3 Metabolizmus

Do nedávna byla považována methylace arsenu za detoxikační proces, jelikož MAs^{V} a DMAs^{V} jsou méně toxické než anorganický arsen¹³. Dnes je methylace považována spíše za bioaktivační proces, jelikož během odbourávání anorganického arsenu vznikají MAs^{III} a DMAs^{III} , které jsou více toxické než anorganický arsen.

Hlavním orgánem, kde dochází k methylaci arsenu, jsou játra³. K methylaci arsenu pravděpodobně napomáhá enzym arsen(3+)-methyltransferasa (AS3MT), dárce methylové skupiny je S-adenosylmethionin (SAM) a kofaktorem je glutathion (GSH).

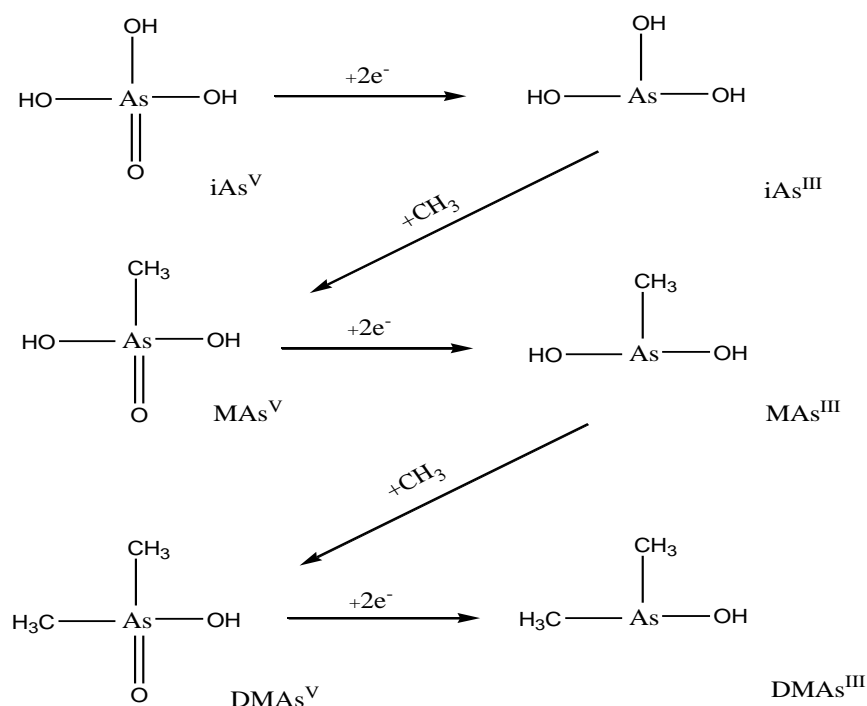
Přesné metabolické dráhy do dnešní doby nejsou známy, ale pro pochopení toxicity arsenu, či jeho využití v léčení je velmi důležité zjistit přesný mechanismus. V dnešní době se předpokládají tři různé metabolické dráhy arsenu. Dlouhou dobu uznávaný mechanismus metabolismu arsenu z roku 1945 od Challengeera dnes doplnily alternativní mechanismy od Hayakawy z roku 2005 a Suzukiho a Naranmandury 2006.

2.3.1 Challengeerova redukčně-oxidativně methylační dráha

První metabolická dráha pro methylaci arsenu byla navržena v roce 1945 Challengeerem. Tato dráha zahrnuje sérii redukcí a oxidativních methylací arsenu¹⁴. Tato dráha pro anorganický arsen je zobrazena na obrázku 2.3.

V této metabolické dráze nejprve dochází k redukci iAs^{V} na iAs^{III} , který posléze podléhá oxidativní methylaci a vzniká MAs^{V} ³. Dále pak opět dochází k redukci na MAs^{III} , který je opět oxidativně methylován na DMAs^{V} . Posledním krokem je redukce na DMAs^{III} .

V dnešních výzkumech bylo ovšem zjištěno, že v lidské moči jsou hlavní složkou pětimocné methylované specie arsenu a tudíž se nejedná o meziprodukt, jak z tohoto mechanismu vyplývá. Také jiné studie dokázaly, že přeměna pětimocných specií na trojmocné probíhá jen s malou pravděpodobností¹⁵.

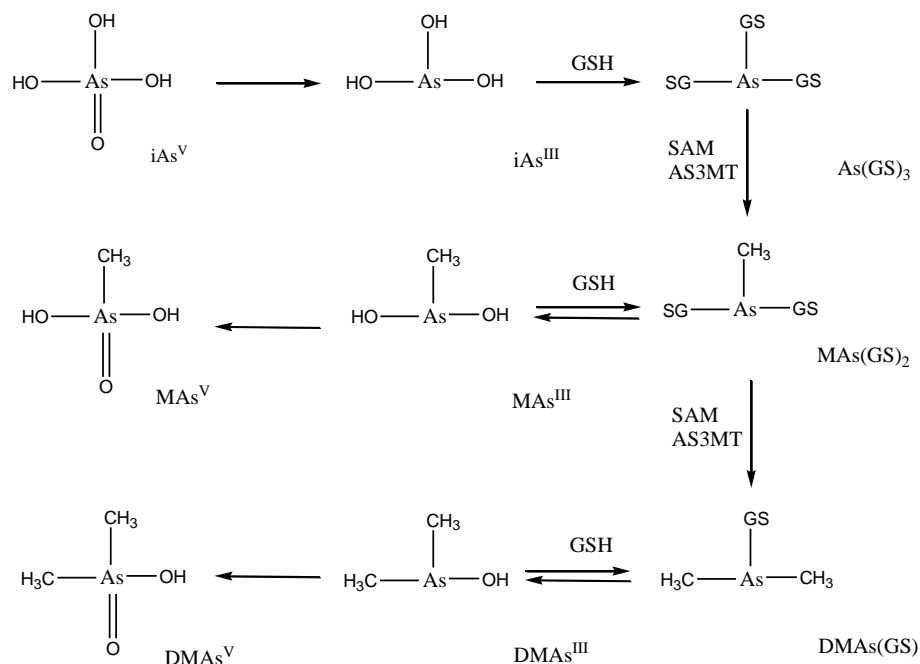


Obr. 2.3 – Oxidativní methylační dráha pro anorganický arsen u savců³.

2.3.2 Hayakawova metabolická dráha arsenu založena na arseno-glutathionových komplexech

Tento mechanismus je založen na tvorbě arseno-glutathionových komplexů³. Anorganický pětímocný arsen je redukován na trojmocný arsen, který je neenzymaticky přeměněn na arseno-glutathionový komplex (As(GS)₃). Tento komplex je dále oxidativní methylací za pomoci AS3MT přeměněn na MAs(GS)₂ a další oxidativní methylací vznikne DMAs(GS).

Tyto dva arseno-glutathionové komplexy jsou nestabilní a jsou hydrolyzovány na MAs^{III} a DMAs^{III}, které se dále oxidují na pětímocné¹⁵, které jsou (jak bylo v předchozí kapitole řečeno) hlavními metabolity v moči³. Mechanismus navržený Hayakawou je zobrazen na obrázku 2.4.

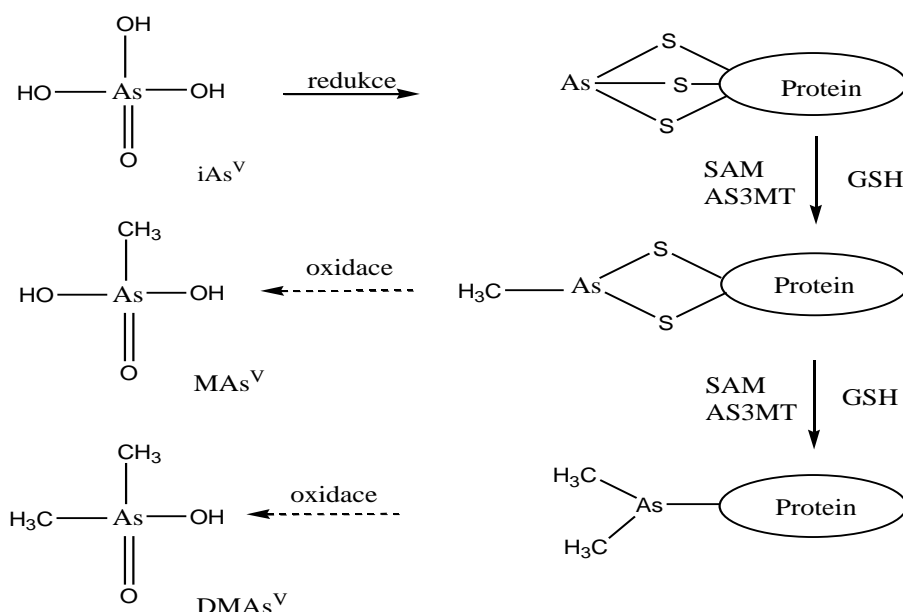


Obr. 2.4 – Schéma metabolismu navržené Hayakawou³.

2.3.3 Mechanismus navržený Suzukim a Naranmandurou

V práci z roku 2006 od Suzukiho a Naranmandury bylo zjištěno, že trojmocný arsen nacházející se v ledvinách a játrech je navázán na rozpustné a nerozpustné proteiny¹⁸. Je to pravděpodobně způsobené tím, že trojmocný arsen má vyšší afinitu na thiolovou skupinu v proteinech než na GSH.

Tento metabolismus je založen na tom, že anorganický trojmocný arsen je vázán v těle na proteiny a poté probíhá postupná oxidativní methylace pomocí AS3MT a za přítomnosti SAM a GSH³. Konečnými produkty jsou MAAs^V a DMA^V a tudíž se opět potvrzuje, že tyto arsenové specie nejsou meziprodukty. Schéma metabolismu je zobrazeno na obrázku 2.5.



Obr. 2.5 – Schéma metabolismu anorganického arsenu navrhované Suzukim a Naranmandurou³.

2. 4. HPLC-ICP-MS

HPLC-ICP-MS je nejčastěji používanou metodou pro speciální analýzu arsenu. Obecně HPLC metody mají vysokou specifiitu a mohou identifikovat široké spektrum arsenových specií¹⁷. ICP-MS je v dnešní době nejvíce používaný detektor pro prvkovou speciální analýzu, protože má vysokou citlivost, široký lineární dynamický rozsah a je snadno kombinovatelný s mnoha separačními technikami³. Kombinací HPLC a ICP-MS zařízení získáme měřicí systém s vysokou citlivostí, velkým dynamickým rozsahem a možností stanovovat více prvků najednou¹⁸.

Mezi nevýhody HPLC-ICP-MS se obecně řadí omezené použití organické mobilní fáze. Tato metoda také neposkytuje žádné informace o struktuře a tím má do značné míry omezenou schopnost identifikovat nové arsenové specie⁷.

2.4.1 Separační techniky v HPLC pro separaci arsenových specií

Pro stanovení organických a anorganických arsenových specií se nejběžněji používá iontově výměnná chromatografie⁹. Základním principem této metody jsou elektrostatické interakce mezi ionty vázanými na povrchu stacionární fáze a nabitými

ionty analytu¹⁹. Tato metoda je tedy vhodná pouze pro separaci iontů anebo snadno ionizovaných sloučenin²⁰. Na separaci má velký vliv rozpustnost stanovované látky, pH mobilní fáze, iontová síla a teplota. Metoda zahrnuje dva separační módy – aniontově a kationtově výměnnou chromatografii. Aniontově výměnná chromatografie je vhodná pro stanovení iAs^{III} , As^V , MAs^V a $DMAs^V$ za použití mobilní fáze o vysoké hodnotě pH¹⁹. Arsenové specie MAs^{III} a $DMAs^{III}$ je naopak vhodné separovat na kationtově výměnné koloně za použití mobilní fáze o nízkém pH.

Separace arseno-glutathionových komplexů pomocí iontově výměnné chromatografie je popsána v práci Raab et. al.⁹, kde bylo zjištěno, že na aniontově výměnné koloně za použití kyselé či bazické mobilní fáze nedochází k separaci komplexů. Na chromatogramu byl zaznamenán pouze chvostující pík, což bylo vysvětleno velmi rychlým rozpadem komplexu na koloně hned na začátku separace. Na kationtově výměnné koloně za použití kyselého pH mobilní fáze se arseno-glutathionové komplexy podařilo detekovat, ale nedošlo k jejich vzájemnému rozdělení.

Další separační technika je chromatografie na obrácených fázích (RPC), která je také velmi hojně využívána pro prvkovou speciální analýzu. Princip této metody je založen na rozdělování molekul analytů mezi dvě zcela nemísitelné fáze. Jedna z fází je stacionární, která má nepolární charakter. Většinou je tvořena silikagelem obsahující chemicky (kovalentně) navázané uhlovodíkové řetězce (C4 – C18). Druhou fází je takzvaná mobilní fáze, která v tomto případě má polární charakter. Tato metoda umožňuje separaci polárních nenabitých sloučenin o relativní molekulové hmotnosti menší než 3000²¹.

Separace arseno-glutathionových komplexů pomocí RPC byla popsána taktéž v práci Raab et. al.⁹, kde za pomoci kolony ODS2 C18 a mobilní fáze v gradientovém módu (tvořena roztokem A: 0,1% kyseliny mravenčí a roztokem B: methanolu a její průtoková rychlost 1 ml.min⁻¹) se podařilo tyto komplexy separovat¹³. Také v práci Kanášové²² za použití C₁₈ kolony a mobilní fáze v gradientovém módu (tvořena roztokem A: 0,1% kyselinou mravenčí a roztokem B: 80% acetonitrilem o průtokové rychlosti 0,25 ml.min⁻¹) se podařilo tyto komplexy separovat. Nevýhodou metody RPC je, že nedochází k separaci jednoduchých arsenových specií^{12,22}.

Pro oddělení nabitých analytů za použití téže kolony, může být RPC upravena

tak, že do mobilní fáze je přidáváno ion-párové činidlo. Metoda je nazývána ion-párová chromatografie.

Ion-párová chromatografie nejčastěji využívá stacionární fáze s alkylovým řetězcem C18. Jako mobilní fáze se používá vodná mobilní fáze s přidavkem ion-párového činidla, modifikátoru a pufrací roztoku.

Jako ion-párové činidlo se používají různě dlouhé řetězce alkylových iontů a nebo tetraalkylamoniové soli, které jsou na jednom konci nabitě a na druhém hydrofobní. Tímto hydrofobním koncem může interagovat se stacionární fází. Ion-párové činidlo umožňuje zadržovat nabitě analyty, které s nimi tvoří iontové páry²⁰. Pro analýzu arsenových specií se využívá činidla tetrabutylamonium hydroxidu (TBAH)²³.

Přídavek modifikátoru do mobilní fáze má za úkol zvýšit rozpustnost analytu a zlepšit smáčivost stěny stacionární fáze. Jako nejběžnější modifikátor v analýze arsenu se používá methanol²¹. Kyselina jablečná je do mobilní fáze přidána jako pufr²⁴.

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující separaci patří koncentrace ion-párového činidla, koncentrace modifikátoru a pufru, pH a iontová síla mobilní fáze a vlastnosti stacionární fáze²⁰. Pro separaci komplexů je velmi důležitým faktorem pH, jelikož má vliv na stupeň ionizace ligandu a tím má vliv i na tvorbu komplexu²³.

Ion-párová chromatografie byla v práci Currier at. el.¹⁷ použita pro separaci jednoduchých arsenových specií v různých matricích. V této práci došli k závěru, že ion-párová chromatografie účinně separuje troj- a pětimocné standardy iAs, MAs a DMAs v DIV nebo TRIS-HCl pufru. Ale pokud je tato metoda použita pro biologické vzorky (lidská moč, sliny), dochází ke ztrátám MAs^{III} a DMAs^{III} na koloně. Vyšší výtěžnost jednoduchých arsenových specií v biologické matrici bylo získáno za použití metody generování hydridů s detekcí atomovou absorpční spektrometrií. Také výzkum Rabieh et. al.⁴ zjistil, že za použití ion-párové HPLC- ICP-MS pro separaci dětské moči získané z míst postižených kontaminací arsenem v Brazílii, lze separovat a detekovat pouze iAs^{III}, iAs^V, MAs^V a DMAs^V. Arsenová specie DMAs^{III} nebyla detekována v důsledku její těkavosti a oxidace na DMAs^V. MAs^{III} byl detekován v případě, že jeho koncentrace byla větší než 2,00 ng As.mL⁻¹. Separace arseno-glutathionových komplexů pomocí ion-párové chromatografie nebyla doposud v literatuře popsána.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- deionizovaná voda získaná pomocí zařízení ULTRAPURE (Watrex, USA)
- tetrabutylamonium hydroxid (TBAH; $M_r = 259,47$; Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina jablečná ($\text{CH}_2(\text{COOH})_2$; $M_r = 104,06$; Sigma-Aldrich, Německo)
- methanol, >99,9% (CH_3OH ; $M_r = 32,04$; Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina mravenčí, 96% p.a. (HCOOH ; $M_r = 46,03$; Penta, Česká republika)
- kyselina dusičná, 65% (HNO_3 ; $M_r = 63,01$; Merck, Německo)
- hydroxid draselný, chemicky čistý (KOH ; $M_r = 56,11$; Lab-Ner, s.r.o., Česká republika)
- kalibrační pH pufr, $\text{pH} = 7,00 \pm 0,02$ při teplotě 25 °C (Mettler-Toledo, Švýcarsko)
- kalibrační pH pufr, $\text{pH} = 4,01 \pm 0,02$ při teplotě 25 °C (Mettler – Toledo, Švýcarsko)
- argon, 99,996 % (SIAD, S.p.A., Česká republika)
- hélium, 99,998 % (SIAD S.p.A., Česká Republika)

3.2 Příprava arsenových standardů

Veškeré pracovní arsenové standardy byly ředěny chlazenou 0,1% kyselinou mravenčí.

Pracovní roztok iAs^{V} (o koncentraci $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) byl přesným ředěním připraven z komerčního zásobního roztoku o koncentraci 1000 mg.L^{-1} v $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ kyselině dusičné (As_2O_5 ; $M_r = 229,84$; Merck, Německo).

Pracovní roztok iAs^{III} (o koncentraci $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) byl přesným ředěním připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 1000 mg.L^{-1} . Zásobní roztok byl připraven z oxidu

arsenitého (As_2O_3 ; $M_r = 198,00$; Lach-Ner, s.r.o, Česká republika) rozpuštěného v 0,5 ml 10% hydroxidu sodného (KOH ; $M_r = 56,11$; Lech-Ner, s.r.o, Česká republika) a doplněn deionizovanou vodou.

Pracovní roztok MA^V (o koncentraci $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) byl přesným ředěním připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 1000 mg.L^{-1} . Zásobní roztok byl připraven z hexahydrátu methylarseničnanu disodného ($\text{Na}_2\text{CH}_3\text{AsO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 291,99$; Chem Service, USA) rozpuštěného v deionizované vodě.

Pracovní roztok DMA^V (o koncentraci $10 \mu\text{g.L}^{-1}$) byl připraven přesným ředěním ze zásobního roztoku o koncentraci 1000 mg.L^{-1} . Tento roztok byl připraven z kyseliny dimethylarseničné ($((\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}))$; $M_r = 137,99$; Chem Service, USA) rozpuštěné v deionizované vodě.

Roztok MA^V (syntetizovaný Ing. Liborem Havlíčkem, CSs., z Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.) byl připraven rozpuštěním pevné látky v chlazené 0,1% kyselině mravenčí (HCOOH , $M_r = 46,03$, Penta, Česká republika). Posléze byl tento roztok dále ředěn chlazenou 0,1% kyselinou mravenčí na požadovanou koncentraci arsenu v roztoku $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Vzniklý roztok byl okamžitě vložen do ledu. Roztok byl připraven těsně před analýzou.

Roztoku DMA^V (syntetizován Ing. Liborem Havlíčkem, CSs., z Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i) byl připraven rozpuštěním kapalné látky chlazenou 0,1% kyselinou mravenčí. Dále byl vzorek naředěn na požadovanou koncentraci arsenu v roztoku ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Roztok byl opět doplněn chlazenou 0,1% kyselinou mravenčí a posléze vložen do ledu. Vzorek byl připraven těsně před analýzou.

Roztok telluru o koncentraci $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ byl připraven ze zásobního roztoku 1000 mg.L^{-1} v 0,2% kyselině dusičné (BDH Prolabo, Velká Británie). Tento roztok byl použit jako vnitřní standard pro ICP-MS.

3.3 Příprava roztoků arseno-glutathionových komplexů

Zásobní roztoky komplexů o koncentraci $\text{As } 50 \mu\text{g.L}^{-1}$ $\text{As}(\text{GS})_3$, $\text{MA}(\text{GS})_2$ a $\text{DMA}(\text{GS})$ (syntetizované Ing. Liborem Havlíčkem, CSs., z Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i, podle publikovaného postupu^{9,25}) byly připraveny rozpuštěním

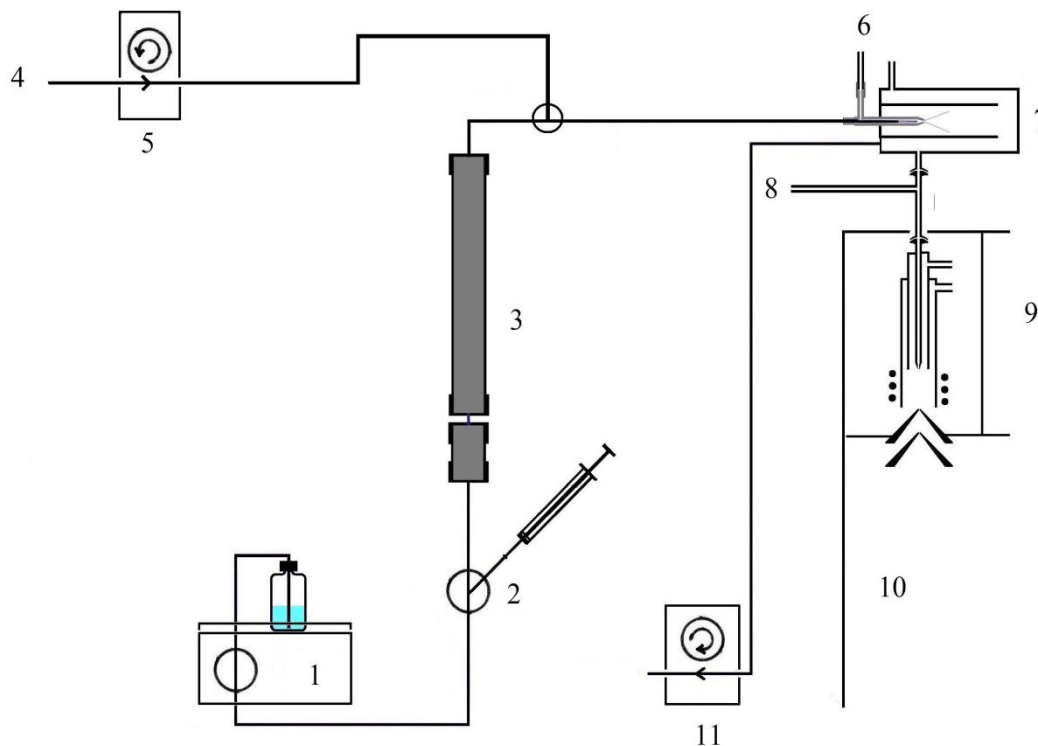
pevné látky v chlazené 0,1% kyselině mravenčí (HCOOH , $M_r = 46,03$, Penta, Česká republika). Posléze byly tyto roztoky dále ředěny chlazenou 0,1% kyselinou mravenčí na požadovanou koncentraci arsenu v roztoku $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Vzniklý roztok byl okamžitě vložen do ledu. Jednotlivé roztoky byly vždy připravovány těsně před analýzou.

3.4 Přístrojové vybavení

- ICP-MS spektrometr 7700x (Agilent Technologies, USA)
- HPLC pumpa 1200 Series (Agilent Technologies, USA)
- HPLC termostatovaný kolonový prostor (Agilent Technologies, USA)
- HPLC vakuovaný odplyňovač (Agilent Technologies, USA)
- separační kolona s předkolonou Prodigy 3μ ODS (3) 100A, 150x4,60 mm (Phenomenex, USA)
- manuální šesticestný dávkovací ventil s 20 μL smyčkou (Rheodyne, USA)
- analytické váhy R160P s přesností 0,00001g (Sartorius, Německo)
- předvážky 600-2r s přesností 0,01g (Kern, Německo)
- pH metr Seven easy (Mettler-Toledo, Švýcarsko)
- membránová pH elektroda In LAB®413 (Mettler-Toledo, Švýcarsko)
- magnetické míchadélko lab disc white (IKA[®], Německo)
- automatické pipety (Biohit, Finsko)
- dávkovací stříkačka o objemu 100 μL (Agilent Technologies, USA)

3.5 Experimentální uspořádání a postup měření

Schéma experimentálního uspořádání je zobrazeno na obrázku 2.1. Vzorek byl dávkován na kolonu pomocí manuálního injekčního ventilu, který zároveň startuje čtecí krok spektrometru. Eluent z kolony byl před vstupem do zmlžovače smíchán s roztokem vnitřního standardu (tellur 250 ng.L^{-1}). Aerosol vzniklý ve zmlžovači byl pak veden proudem nosného plynu do plazmového hořáku.



Obr. 3.1 Schéma HPLC- ICP-MS (1 – duální vysokotlaké pístové čerpadlo, 2 – manuální šesticestný ventil se smyčkou, 3 – kolona s předkolonou, 4 – přívod vnitřního standardu, 5 – peristaltická pumpa, 6 – zmlžovač, 7 – mlžná komora, 8 – přívod ředícího plynu, 9 – plazmový hořák, 10 – ICP-MS spektrometr.

Podmínky měření použité při analýze jsou zaznamenány v tabulce 3.1.

Tab. 3.1 Podmínky měření použité při analýze.

ICP-MS	Agilent 7500x
Průtok nosného plynu (argon)	1,00 L.min ⁻¹
Průtok ředícího plynu	0,15 L.min ⁻¹
Průtok vnitřního standardu	0,20 mL.min ⁻¹
Průtok kolizního plynu (He)	3,50 mL.min ⁻¹
HPLC	Agilent 1260
Použitá kolona	Prodigy 3μ (ODS)3 100A o rozměrech 150x4,60 mm
Mobilní fáze	4,7mM TBAH + 2mM kyselina jablečná + 4% methanol
Dávkovací objem	20 μL
Průtoková rychlost mobilní fáze	1 mL.min ⁻¹
Teplota mobilní fáze	25 °C
pH mobilní fáze	5,85

3.6 Zpracování dat

Naměřené signály byly zaznamenávané a integrované pomocí software MassHunter workstation (Agilent Technologies). Dále pak byla data exportována do programu OriginPro 8.5 (OriginLab, USA), kde byly dále zpracovány.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Arsenové standardy

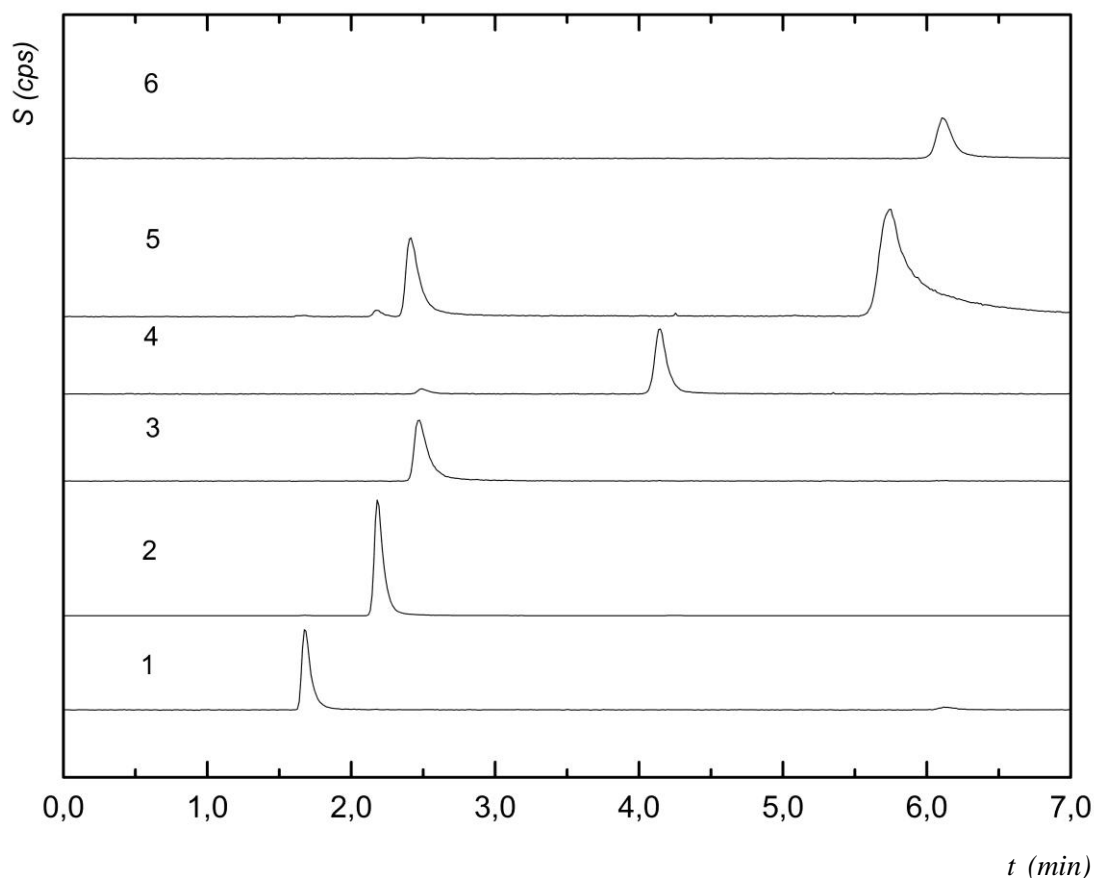
Před vlastním experimentem byly nejprve separovány jednotlivé standardní roztoky arsenových specií (iAs^{III} , iAs^V , MAs^V , $DMAs^V$, $MAs^{III}O$, $DMAs^{III}I$) pro zjištění jejich retenčních časů (t_R). Výsledné retenční časy jednoduchých specií jsou zaznamenány v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1- Retenční časy jednoduchých arsenových specií (iAs^{III} , iAs^V , MAs^{III} , MAs^V , $DMAs^{III}$, $DMAs^V$) separované pomocí systému HPLC-ICP-MS. Použitá kolona Prodigy ODS (3). Použitá vodná mobilní fáze obsahující 4,7mM TBAH, 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanol o pH = 5,85, průtoková rychlost 1 mL.min⁻¹ v isokratickém módu, teplota mobilní fáze 25 °C.

jednoduché arsenové specie (seřazeny podle rostoucího t_R)						
	iAs^{III}	iAs^V	MAs^{III}	MAs^V	$DMAs^{III}$	$DMAs^V$
retenční čas [min]	1,6	6,1	2,1	4,1	5,7	2,4

Získané retenční časy odpovídají publikované práci Currier at. all.¹⁷, kde byla použita stejná kolona a obdobné separační podmínky.

Z chromatogramu je také vidět (Obr. 4.1), že v roztoku iAs^{III} byl zaznamenán pík iAs^V . Je to způsobené pomalou oxidací iAs^{III} . Na chromatogramu MAs^V byla zaznamenaná kontaminace $DMAs^V$. Chromatografický záznam $DMAs^{III}$ (Obr. 4.1) obsahuje další jednoduché arsenové specie a to pravděpodobně MAs^{III} a $DMAs^V$. Přítomnost dalších specií je způsobena velkou nestabilitou komplexu a jeho následných oxidací (tato nestabilita $DMAs^{III}$ je popsána v práci Gong et al.⁵).



Obr. 4.1 Chromatogramy jednoduchých arsenových specií získané pomocí HPLC-ICP-MS (1 - iAs^{III} , 2 - MA^{III} , 3 - DMA^{IV} , 4 - MA^{V} , 5 - DMA^{III} , 6 - iAs^{V}). Separace arsenových specií na koloně ODS (3). Použitá vodná mobilní fáze obsahující 4,7mM TBAH, 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanol o pH = 5,85 a průtoková rychlost 1 mL.min⁻¹ v isokratickém módu. Teplota mobilní fáze 25 °C. Koncentrace iAs^{III} , iAs^{V} , MA^{V} a DMA^{IV} 10 µg.L⁻¹, koncentrace MA^{III} a DMA^{III} 100 µg.L⁻¹.

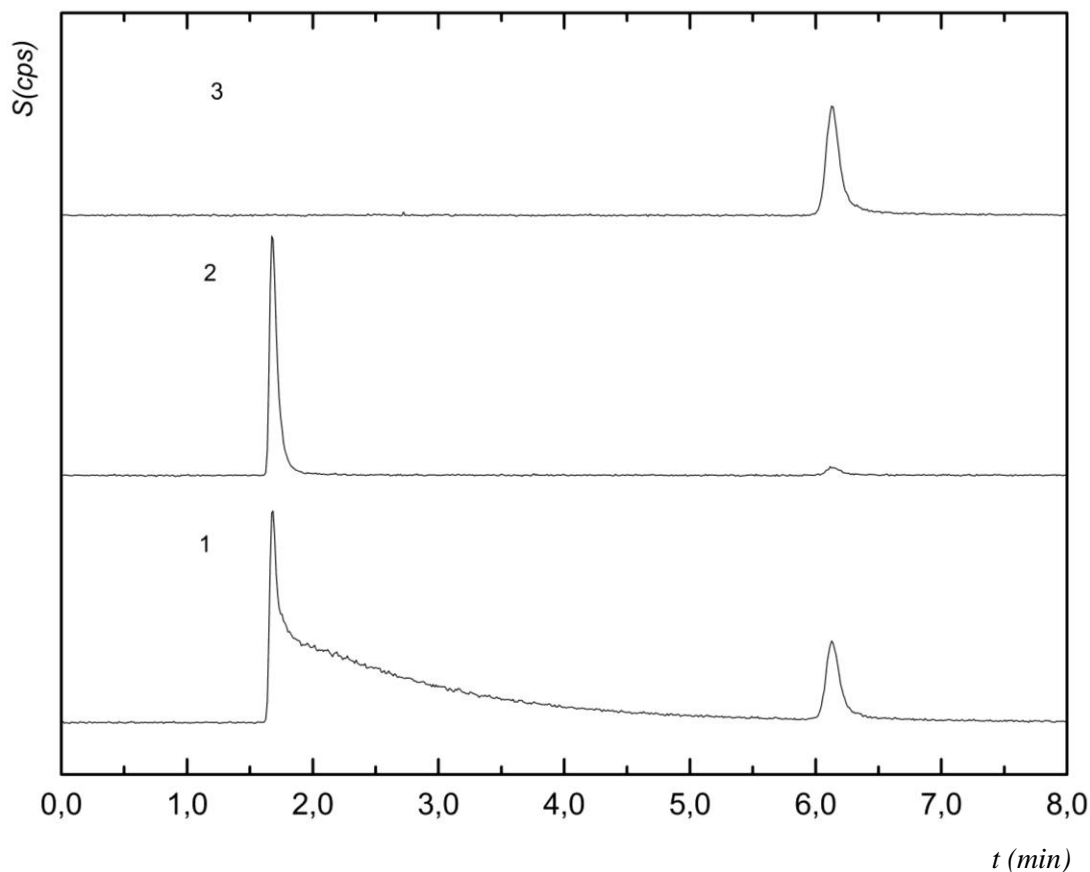
4.2 Arseno-glutathionové komplexy

Roztoky jednotlivých glutathionových komplexů o koncentraci arsenu 100 µg.L⁻¹ rozpuštěné v 0,1% kyselině mravenčí byly separovány okamžitě po jejich přípravě. Pro další analýzu byly uschovány v ledu.

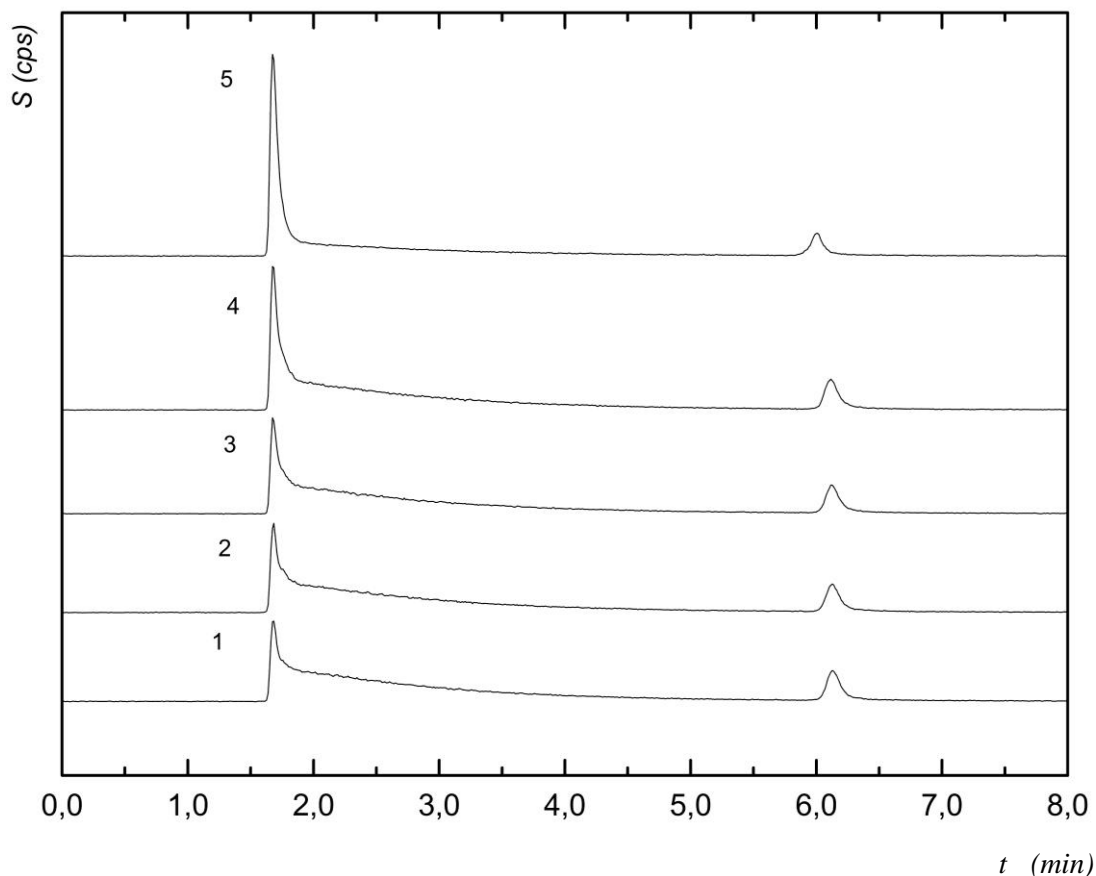
4.2.1 Separace komplexu $As(GS)_3$

Na chromatografickém záznamu standardu $As(GS)_3$ (Obr. 4.2) je možno vidět dva ostré píky. První pík má stejný retenční čas jako iAs^{III} a na něj navazuje rozmytý

signál. Tento signál (Obr. 4.3) se během dalších analýz zmenšuje. Měření téhož vzorku druhý den ukazuje, že široký pík vymizel. Pravděpodobně se jedná o pozůstatek glutathionového komplexu, který se nepodařilo na koloně odseparovat a postupem času se díky jeho nestabilitě rozpadl na jednoduché arsenové specie. Druhý pík na chromatografickém záznamu (Obr. 4.2) odpovídá iAs^V .



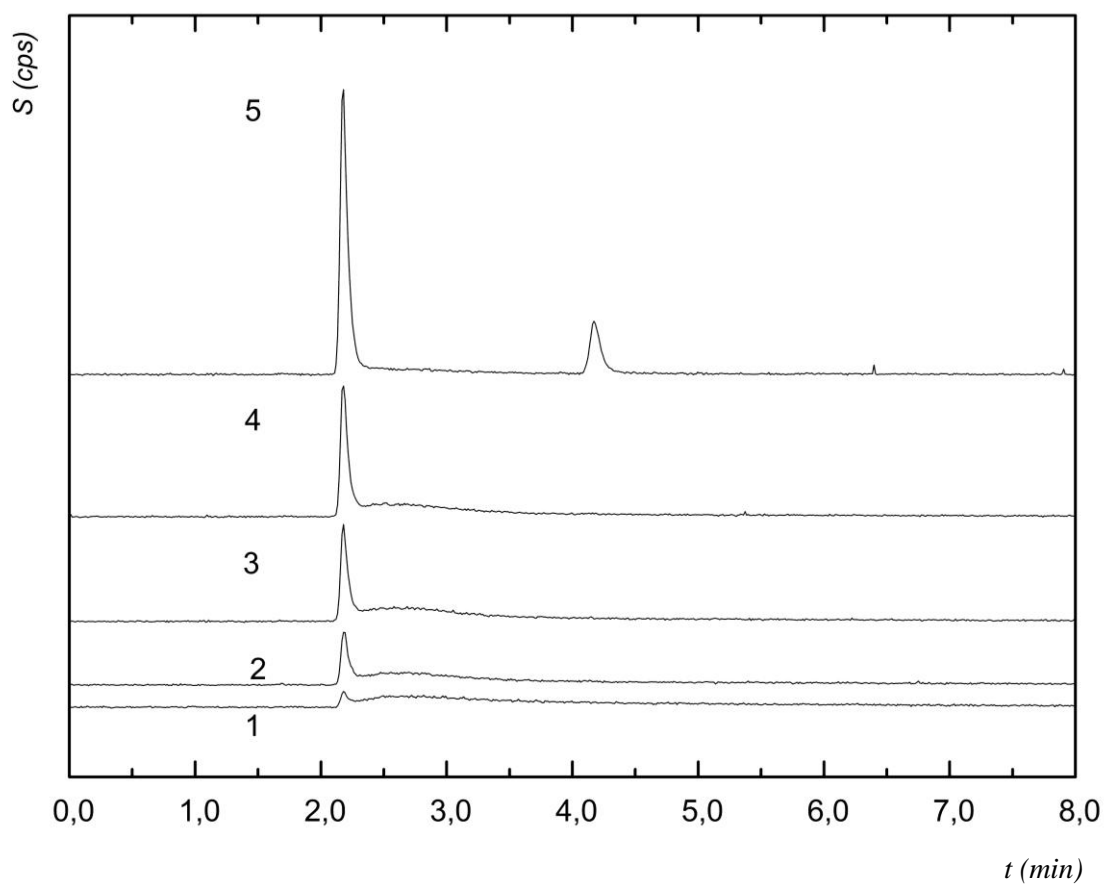
Obr. 4.2 Separace komplexu $As(GS)_3$ pomocí HPLC-ICP-MS a následné porovnání s jednoduchými arsenovými speciem. (1 – chromatogram komplexu $As(GS)_3$, 2 – iAs^{III} , 3 – iAs^V). Separace proběhla na koloně ODS (3) za použití vodné mobilní fáze obsahující 4,7mM TBAH, 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanol o pH=5,85 a průtoková rychlost mobilní fáze 1 mL.min⁻¹ v isokratickém módu a při teplotě 25 °C.



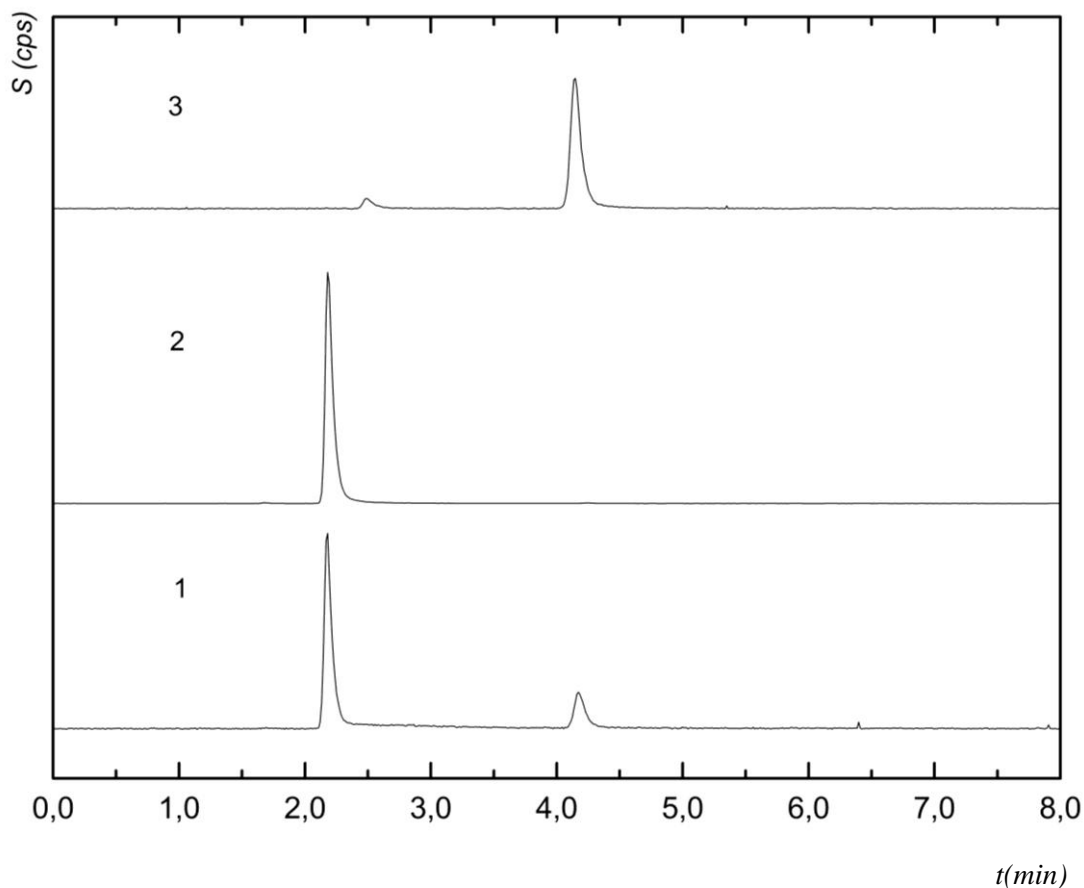
Obr. 4.3 Separace glutathionové komplexu $\text{As}(\text{GS})_3$ pomocí HPLC-ICP-MS (1 – separace po přípravě vzorku, 2 – 16 minut od přípravy vzorku, 3 – 32 minut od přípravy, 4 – 89 minut od přípravy, 5 – 24 hodin od přípravy vzorku). Separace proběhla na koloně ODS (3) za použití vodné mobilní fáze obsahující 4,7mM TBAH, 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanol o $\text{pH}=5,85$, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ v isokratickém módu o teplotě 25°C .

4.2.2 Separace komplexu $\text{MAs}(\text{GS})_2$

U separace komplexu $\text{MAs}(\text{GS})_2$ těsně po přípravě byl detekován jeden pík (Obr. 4.4) spojený pravděpodobně se zbytkem glutathionové komplexu. První pík (Obr. 4.5) odpovídá retenčním časem MAs^{III} . Během dalších měření se glutathionový zbytek rozkládal. Při analýze tohoto roztoku druhý den byl zaznamenán již druhý pík se stejným retenčním časem jako arsenová specie MAs^{V} . Součet ploch všech píků se s časem nemění. Samostatný pík pro komplex $\text{MAs}(\text{GS})_2$ se za těchto separačních podmínek nepodařilo získat.



Obr. 4.4 Separace glutathionové komplexu $\text{MAS}(\text{GS})_2$ pomocí HPLC-ICP-MS (1 – separace po přípravě vzorku, 2 – separace po 18 minutách od přípravy, 3 – separace po 35 minutách, 4 – separace po 51 minutách, 5 – separace po 24 hodinách). Separace proběhla na koloně ODS (3) za použití vodné mobilní fáze obsahující 4,7mM TBAH, 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanolu o $\text{pH}=5,85$. Průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ v isokratickém módu o teplotě 25°C .



Obr. 4.5 Separace komplexu $\text{MAs}(\text{GS})_2$ pomocí HPLC-ICP-MS a porovnání s jednoduchou arsenovou specíí (1– chromatogram glutathionového komplexu $\text{MeAs}(\text{GS})_2$, chromatografický záznam zaznamenaný po 24 hodinách od přípravy, 2 – MAs^{III} , 3 - MAs^{V}). Separace na koloně (ODS) 3 za použití vodné mobilní fáze obsahující 4,7mM TBAH, 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanol o pH = 5,85. Průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ v isokratickém módu a teplota 25°C .

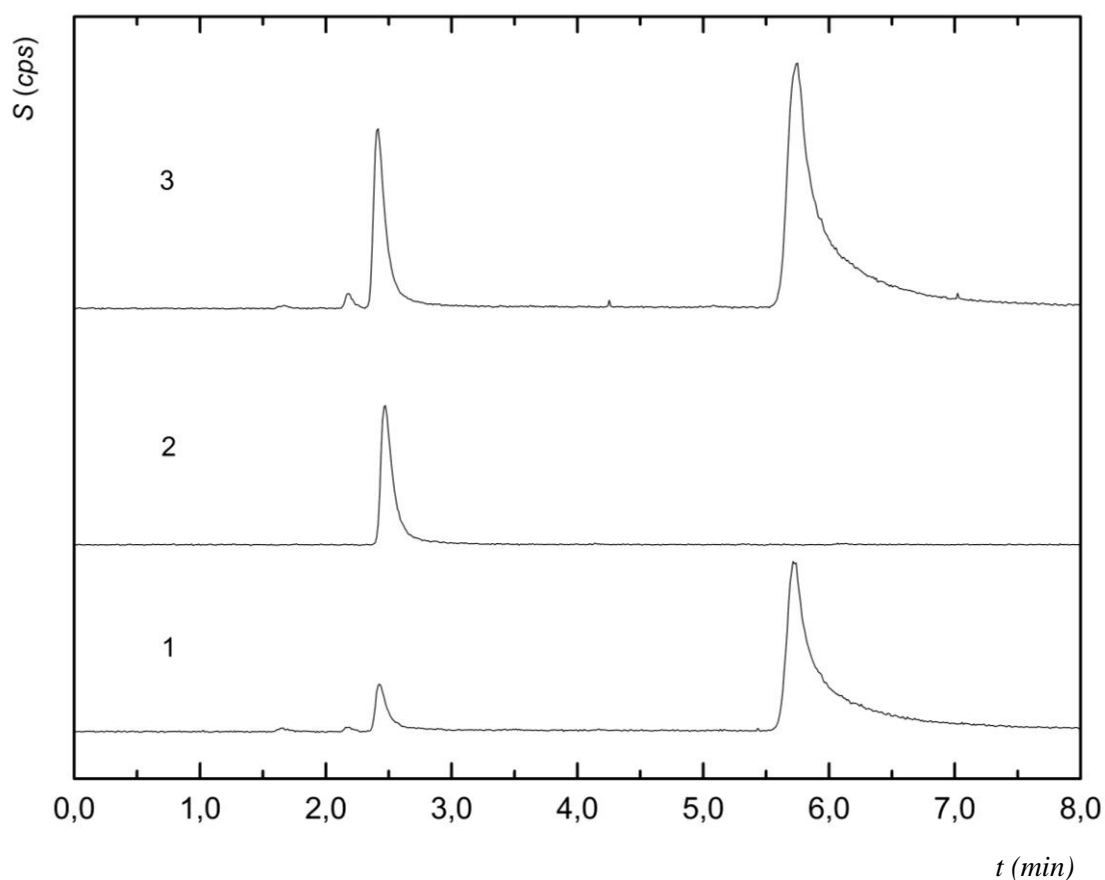
4.2.3 Separace komplexu $\text{DMAs}(\text{GS})$

Separace komplexu $\text{DMAs}(\text{GS})$ se za těchto experimentálních podmínek taktéž nepovedla. Daný komplex se na koloně rozpadl na jednoduché arsenové specie.

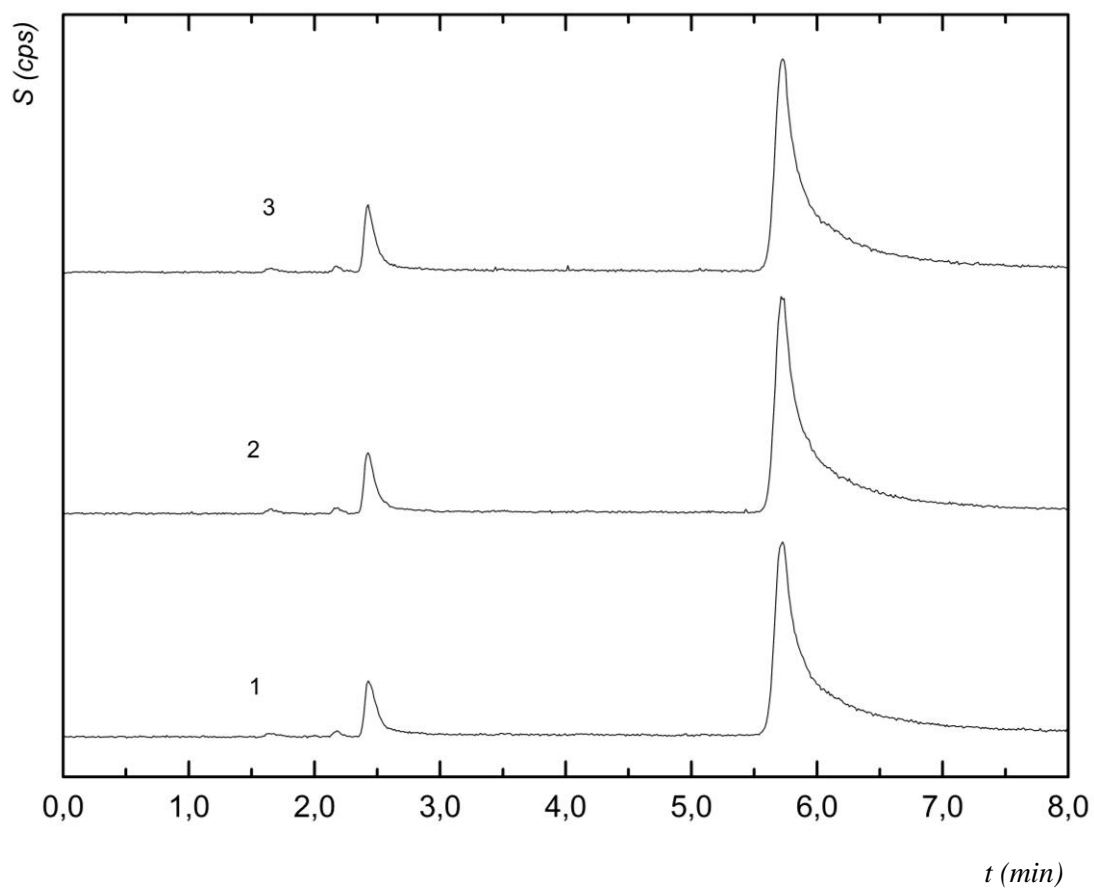
Z chromatografického záznamu (Obr. 4.6) jsou patrné čtyři arsenové specie. První pík odpovídá iAs^{III} , druhý pík odpovídá retenčnímu času MAs^{III} . Tyto dva píky jsou oproti zbylým dvěma výrazně menší. Pravděpodobně se jedná o rozpadové produkty DMAs^{III} nebo o kontaminaci. Třetí pík (Obr. 4.6) je pravděpodobně DMAs^{V} . Poslední, čtvrtý, pík (Obr. 4.6) je s největší pravděpodobností DMAs^{III} .

Plocha jednotlivých píků (Obr. 4.7) se během třech za sebou jdoucích stanovení

výrazně neměnila. To naznačuje, že zde nebyl detekován žádný pozůstatek glutathionového komplexu.



Obr. 4.6 Separace komplexu DMAs(GS) a následné porovnání s jednoduchými arsenovými speciem pomocí HPLC-ICP-MS (1 – chromatogram komplexu DMAs(GS), 2 – DMAs^V, 3 – DMAs^{III}). Separace proběhla na koloně ODS (3), mobilní fáze byla použita 4,7mM TBAH, 2mM kyselina jablečná a 4% methanol o pH = 5,85, průtoková rychlost 1 mL.min⁻¹ v isokratickém módu. Teplota mobilní fáze 25°C.



Obr. 4.7 Separace glutathionové komplexu DAs(GS) pomocí HPLC-ICP-MS (1– separace po přípravě vzorku, 2 – separace po 16 minutách od přípravy, 3 – separace po 32 minutách,). Separace proběhla na koloně ODS (3) za použití vodné fáze obsahující 4,7mM TBAH, 2mM kyselinu jablečnou a 4% methanol o pH=5,85. Průtoková rychlost mobilní fáze 1 mL.min⁻¹ v isokratickém módu a o teplotě 25 °C.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na separaci složitých arsenových specií se zaměřením na arseno-glutathionové komplexy. Tyto komplexy hrají důležitou roli při metabolismu arsenu v lidském těle a jejich separace a následná detekce je velmi důležitá pro přesné určení metabolické dráhy arsenu.

Separace probíhala pomocí ion-párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie za použití kolony Prodigy ODS (3) s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Jednoduché arsenové specie, které sloužily jako standardy, se podařilo separovat. Arseno-glutathionové komplexy (As(GS)_3 a MAs(GS)_2) za těchto experimentálních podmínek poskytovaly pík a na něj navazující rozmytý signál, který po opakovaném měření vymizel. Pravděpodobně se jednalo o zbytek glutathionového komplexu, který se na koloně zadržoval a postupně se rozkládal a také díky jejich nestabilitě se komplexy s postupným měřením rozkládaly na jednoduché specie. Komplex DMA(GS) neposkytoval žádný signál. Na chromatografickém záznamu byly zaznamenány pouze signály jednoduchých specií.

Tato metoda je tedy nevhodná pro stanovení arseno-glutathionových komplexů v biologických matricích, jelikož ani ve vodných roztocích se nepodařilo jednotlivé komplexy separovat. Pro stanovení jednotlivých komplexů je nutné najít jinou vhodnou separační metodu a nebo použít například chromatografii na obrácených fázích, kde se jednotlivé arseno-glutathionové komplexy separují.

Literatura

1. Mandal, B.K.; Suzuki, K.T.: Arsenic round the world: A review. *Talanta* **58**, 201-235 (2002).
2. Komorowicz I.; Barańkiewicz D.; Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry – Last decade review; *Talanta* **84**, 247-261 (2011).
3. Rehman, K.; Naranmandura, H.: Arsenic metabolism and thioarsenicals; *Metallomics* **4**, 881-892 (2012).
4. Rabieh S.; Hirner A.V.; Matschullat J.: Determination of arsenic species in human urine using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**, 544-549 (2008).
5. Gong Z.; Lu X.; Cullen W.R.; Le X.Ch.; Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **16**, 1409-1413 (2001).
6. Petrick, J.S.; Ayala-Fierro, F.; Cullen, W.R.; Carter, D.E.; Aposhian, H.V.: Monomethylarsonous Acid (MMA^{III}) Is More Toxic Than Arsenite in Chang Human Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **163**:2, 203-207 (2000).
7. Francesconi K.A.; Kuehnelt D.; Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003; *Analyst* **129**, 273-395 (2004).
8. Kala S.V.; Nely M.W.; Kala G.; Prater CH.I.; Atwood D. W.; Rice J. S.; Lieberman M. W.; The MRP2/cMOAT transporter and Arsenic-Glutathione Complex Formation Are Required for Biliary Excretion of Arsenic; *The Journal of biological chemistry* **43**, 33404-33408 (2000).
9. Raab A.; Meharg A. A.; Jaspars M.; Genney D.R.; Feldmann J.; Arsenic-glutathione complexes – their stability in solution and during separation by different HPLC modes; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19**;183-190 (2004).
10. Lindemann T.; Prange A.; Dannecker W., Neidhart B.; Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS; *Fresenius Journal Analytical Chemistry* **368**, 214-220 (2000).
11. Kobayashi Y.; Cui X.; Hirano S.; Stability of arsenic metabolites, arsenic triglutathione [As(GS)₃] and methylarsenic diglutathione [CH₃As(GS)₂], in rat bile, *Toxicology* **211**, 115-123 (2005).
12. Yehiayan L.; Pattabiraman M.; Kavallieratos K.; Wang X.; Boise L. H.; Cai Y.; Speciation, formation, stability and analytical challenges of human arsenic metabolites; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **24**, 1397-1405 (2009).
13. Hayakawa T.; Kobayashi Y.; Cui X.; A new metabolic pathway of arsenite: arsenic–glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19; *Arch Toxicol* **79**, 183-191 (2005).
14. Challenger, F.: Biological methylation. *Chemical Reviews* **36**, 315-361 (1945)

15. Cohen, S.M.; Arnold, L.L.: Methylated Arsenicals: The Implications of Metabolism and Carcinogenicity Studies in Rodents to Human Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* **36**, 99-133 (2006).
16. Naranmandura, H.; Suzuki, N.; Suzuki, K.T.: Trivalent Arsenicals Are Bound to Proteins during Reductive Methylation. *Chemical Research in Toxicology* **19**, 1010-1018 (2006).
17. Currier J.M.; Saunders J.; Ding L.; Bodnar W.; Cable P.; Matoušek T.; Creed J.T.; Stýblo M.: Comparative oxidation state specific analysis of arsenic species by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry and hydride generation-cryotrapping- atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**:6, 843-852 (2013).
18. Gong, Z.; Lu, X.; Ma, M.; Watt, C.; Le, X.Ch.: Arsenic speciation analysis. *Talanta* **58**, 77-96 (2002).
19. Xie R.; Johnson W.; Spayd S.; Hall G.S.; Buckley B.: Arsenic speciation analysis of human urine using ion Exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica chimica acta* **578**, 186-194 (2006).
20. B'Hymer, C.; Caruso, J.A.: Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1045**, 1-13 (2004).
21. Szpunar, J.: Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *The Analyst* **125**, 963 -988 (2000).
22. Kanášová M.: Separácia toxikologicky významných špecií arzénu pre špeciálnu analýzu pomocou RP- HPLC-ICP-MS, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (2013).
23. Cecchi T.: Ion Pairing Chromatography. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **38**, 161-213 (2008).
24. Le X.CH.: *Speciation of arsenic in water and biological matrices United States*, American Water Works Association 2001.
25. Cullen, W. R.; McBride, B. C.; Reglinski, J.: The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications. *Journal of Inorganic Biochemistry* **21**:3, 179-194 (1984).